

抗微生物精油组合物、包含其的制品及制品的制备方法

相关申请的交叉引用

本申请要求于2021年04月30日提交的题为“抗微生物精油组合物、包含其的产品及其制备方法”的中国发明专利申请第202110482092.1号以及于2022年01月19日提交的题为“抗微生物精油组合物、包含其的产品及其制备方法”的中国发明专利申请第202210059971.8号的优先权，上述申请通过引用在此全文并入。

10 技术领域

本申请大体上涉及一种精油组合物，更具体而言，涉及具有抗微生物功能的植物精油组合物。本申请还涉及包含抗微生物精油组合物的制品和包含抗微生物精油组合物的制品的制备方法。

15 背景技术

很多高致病性微生物病原体引起迅速发作和蔓延的传染病。这样的传染病甚至能在短时间内跨越数省、数国乃至在全世界范围内流行，即，迅速发展为“大流行（pandemic）”。例如，2019年底开始爆发的2019冠状病毒病（COVID-19，也称“新冠病毒肺炎”）已被世卫组织认定为符合“大流行”的特征。

大流行期间，消杀是疫情防控的一项重要工作。目前，世界范围内通常使用合成化学品类消杀产品（如乙醇、过氧乙酸、含氯消毒剂、酚类消毒剂等）、紫外线、热等来灭活致病性微生物。例如，酚类消毒剂曾经是医院的主要消毒剂之一，为预防和控制传染性疾病的传播起过重要作用。在高浓度下，酚类可裂解并穿透细胞壁，使菌体蛋白凝集沉淀，快速杀灭细胞；在低浓度下，可使细菌的酶系统失去活性，导致细胞死亡。但是，此类消杀措施存在应用不便，使用受限，或对人体、环境易于造成二次危害污染的风险。

基于天然植物的精油产品传统上用于治疗传染病和疫情防控已有数千年历史。特别是酚类精油，具有优异的抗菌效果。但该类别精

油也因其具有毒性，并会对皮肤与黏膜组织产生刺激，在实际应用中要求慎用。其他部分植物精油的抗微生物活性也已被许多研究证实。此类植物精油产品，在灭活致病性微生物的同时，对人体无害，对环境友好，符合绿色环保、可持续发展趋势。

5 因此，需要提供具有抗微生物活性的植物精油类产品。

我们意外地发现，通过使用多种单方精油的组合，配合特定的抗微生物活性成分，能够得到具有良好的抗微生物性能并且对人体无害和对环境友好的消杀产品。

10 发明内容

为解决以上问题，在本申请的实施方式中提供了一种抗微生物精油组合物，其中，该精油组合物的组分均来自于天然植物，这些组分的组合使得所形成的精油组合物具有良好的抗微生物性能。

本申请至少一实施方式提供了一种抗微生物精油组合物，基于组
15 合物的总重，所述微生物精油组合物包含：(1) 0.0001-80%的选自香芹酚和百里香酚中的一种或多种；(2) 0.0001-99.9%的选自柠檬油、甜橙油、玳玳果皮油、白柠檬油和柚皮油中的一种或多种；(3) 0.0001-99.9%的选自亚洲薄荷素油、亚洲薄荷油、椒样薄荷油和胡薄荷油中的一种或多种；(4) 0.0001-20%的选自月桂叶油和甘牛至油中的一种
20 或多种；(5) 0.0001-20%的选自广藿香油、檀香油和迷迭香油中的一种或多种；(6) 0.0001-20%的选自天竺葵油、松针油和柏木油中的一种或多种；和(7) 任选地，0.0001-20%的选自紫苏油、杭白菊油和牡荆叶油中的一种或多种。

在一个方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
25 (1) 2-80%的选自香芹酚和百里香酚中的一种或多种；(2) 2-50%的选自柠檬油、甜橙油、玳玳果皮油、白柠檬油和柚皮油中的一种或多种；(3) 5-40%的选自亚洲薄荷素油、亚洲薄荷油、椒样薄荷油和胡薄荷油中的一种或多种；(4) 2-20%的选自月桂叶油和甘牛至油中的一种或多种；(5) 0.1-5%的选自广藿香油、檀香油和迷迭香油中的一
30 种或多种；(6) 2-20%的选自天竺葵油、松针油和柏木油中的一种或

多种；和（7）任选地，2-15%的选自紫苏油、杭白菊油和牡荆叶油中的一种或多种。

在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物还任选地包含选自下组的一种或多种：（8）0.0001-20%的金银花油；（9）
5 0.0001-20%的川芎油；（10）0.0001-20%的苍耳子油；和（11）0.0001-20%的连翘油。

在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
（1）5%的香芹酚和5%的百里香酚；（2）35%的柠檬油；（3）30%
的亚洲薄荷素油；（4）10%的月桂叶油；（5）0.5%的广藿香油；（6）
10 5%的天竺葵油；和（7）9.5%的紫苏油。

在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
（1）0.005%的香芹酚和0.005%的百里香酚；（2）0.1%的柠檬油；
（3）99.58%的亚洲薄荷素油；（4）0.005%的月桂叶油；（5）0.25%
的广藿香油；（6）0.005%的天竺葵油；和（7）0.05%的紫苏油。

15 在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
（1）0.005%的香芹酚和0.005%的百里香酚；（2）99.5%的柠檬油；
（3）0.25%的亚洲薄荷素油；（4）0.005%的月桂叶油；（5）0.18%
的广藿香油；（6）0.005%的天竺葵油；和（7）0.05%的紫苏油。

在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
20 （1）51.25%的香芹酚；（2）26.25%的百里香酚；（3）8.75%的柠檬
油；（4）7.5%的亚洲薄荷素油；（5）2.5%的月桂叶油；（6）0.125%
的广藿香油；（7）1.25%的天竺葵油；和（8）2.375%的紫苏油。

在另一方面，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：
（1）25%的香芹酚和25%的百里香酚；（2）2%的柠檬油；（3）10%
25 的亚洲薄荷素油；（4）20%的月桂叶油；（5）0.5%的广藿香油；（6）
2%的天竺葵油；（7）5%的金银花油；（9）4%的川芎油；（10）0.3%
的苍耳子油；和（11）0.2%的连翘油。

在又一方面，所述微生物选自细菌、真菌、病毒、支原体及其组合。

30 在又一方面，所述微生物为新冠病毒、流感病毒、鼻病毒、呼吸

道合胞体病毒、肠道病毒、腺病毒、疱疹病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒中的一种或多种。

在又一方面，所述微生物为新冠病毒。

在又一方面，所述微生物为肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、白色葡萄球菌和白色念珠菌中的一种或多种。

在又一方面，所述微生物为肺炎支原体。

本申请至少一实施方式还提供了一种包含抗微生物精油组合物的制品。

10 在一个方面，所述制品包括能够在硬表面、纺织品、皮肤、粘膜或毛发中的一种或多种上减少或杀灭微生物的制品。

在另一方面，所述制品为选自口罩爆珠、卫生湿巾、空气清新剂、口腔喷雾、洗手液、洗发水、护发素、沐浴液、化妆品、护肤品、空气凝胶、抑菌喷雾、表面清洁剂和洗涤剂中的一种或多种。

15 在另一方面，所述制品为防护用品。

在另一方面，所述制品为选自民用口罩、医用口罩、防护手套、防护衣中的一种或多种。

在另一方面，所述制品为爆珠口罩。

在另一方面，所述制品为食品或保健品。

20 在另一方面，所述制品为选自口香糖、香口丸、爆珠、凝胶糖果、硬糖、饮料、膳食补充剂中的一种或多种。

本申请至少一实施方式还提供了一种制备包含抗微生物精油组合物的制品的方法，包括：将所述抗微生物精油组合物的所有成分均匀混合，制成精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠，将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠与所述制品的其他组分组合，得到所述制品。

25 在一个方面，所述制品为民用口罩或医用口罩，所述将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠与所述制品的其他组分组合包括将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠添加到所述民用口罩或所述医用口罩中。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅涉及本公开的一些实施例，而非对本公开的限制。

5 图 1 示出了根据本申请至少一实施方式的各种复方精油对 H1N1、H3N、FluB、hRHV、RSV 的抑制率比较；

图 2 示出了根据本申请至少一实施方式的各种复方精油对多种革兰氏阳性细菌的最小抑菌浓度；

10 图 3 示出了根据本申请至少一实施方式的各种复方精油对多种革兰氏阴性细菌的最小抑菌浓度。

具体实施方式

为了下面的详细描述的目的，应当理解，本申请可采用各种替代的变化和步骤顺序，除非明确规定相反。此外，除了在任何操作示例
15 中，或者以其他方式指出的情况下，表示例如说明书和权利要求中使用的成分的量的所有数字应被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。因此，除非相反指出，否则在以下说明书和所附权利要求中阐述的数值参数是根据本申请所要获得的期望性能而变化的近似值。至少并不是试图将等同原则的适用限制在权利要求的范围内，每个数值参数至
20 少应该根据报告的有效数字的个数并通过应用普通舍入技术来解释。

尽管阐述本申请的广泛范围的数值范围和参数是近似值，但是具体示例中列出的数值尽可能精确地报告。然而，任何数值固有地包含由其各自测试测量中发现的标准偏差必然产生的某些误差。

此外，应当理解，本文所述的任何数值范围旨在包括归入其中的
25 所有子范围。例如，“1至10”的范围旨在包括介于（并包括）所述最小值1和所述最大值10之间的所有子范围，即具有等于或大于1的最小值和等于或小于10的最大值。

在本申请中，除非另有明确说明，单数的使用包括复数且复数包含单数。此外，在本申请中，除非另有明确说明，否则使用“或”表示
30 “和/或”，即使在某些情况下可明确地使用“和/或”。此外，在

本申请中，除非另有明确说明，否则使用“一(a)”或“一(an)”表示“至少一”。例如，“一种”聚合物，“一种”组合物等指这些物品中的任何的一种或多种。

在本申请的一个实施方式中，提供了一种抗微生物精油组合物。
5 如本文中所用的，术语“抗微生物”是指所用的产品具有减少/杀灭微生物的活性。在本申请的上下文中，“微生物”可以包括细菌、真菌、病毒、支原体等，例如但不限于，冠状病毒（例如，SARS-CoV（非典病毒）、MERS-CoV（中东呼吸综合征病毒）、SARS-CoV-2（新冠病毒）等）、肝炎病毒（如甲型、乙型、丙型肝炎病毒）、流感病毒
10 （如甲型、乙型流感病毒和禽流感病毒等）、金黄色葡萄球菌、肺炎杆菌、伤寒菌、念珠菌、霉菌、肺炎支原体等。在一个优选方面，本申请的上下文中的病毒可为新冠病毒。

如本文中所用的，术语“植物精油”是指从天然香料植物中加工提取所得到的挥发性含香物质的总称。通常，植物精油是从植物的花、
15 叶、根、种子、果实、树皮、树脂、木心等部位通过水蒸气蒸馏法、冷压榨法、脂吸法或溶剂萃取法提炼萃取的挥发性芳香物质。植物精油往往具有特定的生物活性，尤其是，有些植物精油具有良好的抗微生物活性，如抗菌、抗真菌和/或抗病毒活性，可以作为有效的环保型抗微生物剂。植物精油可分为单方和复方精油。其中，与单方精油相比，
20 复方精油中包含多种有效的精油成分，通过各成分的协同作用，能够实现显著更好的生物学活性，如抗微生物活性。在本申请中优选使用复方精油。

本申请至少一实施方式提供了一种抗微生物精油组合物，包含：

(1)选自香芹酚和百里香酚中的一种或多种，其量可以为0.0001-
25 99.99%，优选2-80%，更优选2-60%，进一步优选6-16%；

(2)选自柠檬油、甜橙油、玳玳果皮油、白柠檬油和柚皮油中的一种或多种，其量可以为0.0001-99.99%，优选2-80%，更优选2-50%，更优选10-50%，进一步优选32-38%；

(3)选自亚洲薄荷素油、亚洲薄荷油、椒样薄荷油和胡薄荷油
30 中的一种或多种，其量可以为0.0001-99.99%，优选2-80%，更优选5-

40%，进一步优选28-35%；

(4) 选自月桂叶油和甘牛至油中的一种或多种，其量可以为0.0001-20%，优选2-20%，更优选2-18%，更优选2-15%，进一步优选8-12%；

5 (5) 选自广藿香油、檀香油和迷迭香油中的一种或多种，其量可以为0.0001-20%，优选0.1-18%，更优选0.1-5%，进一步优选0.3-1%；

(6) 选自天竺葵油、松针油和柏木油中的一种或多种，其量可以为0.0001-20%，优选2-20%，更优选2-18%，进一步优选3-8%，

以上百分比基于组合物的总重。

10 在一个方面，抗病毒精油组合物还可以任选地包含(7) 选自紫苏油、杭白菊油和牡荆叶油中的一种或多种，其量可以为0.0001-20%，优选2-18%，更优选2-15%，进一步优选8-12%，以上百分比基于组合物的总重。

在另一方面，抗病毒精油组合物还可以任选地包含选自(8)
15 0.0001-20%的金银花油；(9) 0.0001-20%的川芎油；(10) 0.0001-20%的苍耳子油；和(11) 0.0001-20%的连翘油中的一种或多种，以上百分比基于组合物的总重。

例如但不限于，本申请所述的抗微生物精油组合物的一个优选示例可以包含：(1) 5%的香芹酚和 5%的百里香酚；(2) 35%的柠檬
20 油；(3) 30%的亚洲薄荷素油；(4) 10%的月桂叶油；(5) 0.5%的广藿香油；(6) 5%的天竺葵油；和(7) 9.5%的紫苏油，以上百分比基于组合物的总重。

例如但不限于，本申请所述的抗微生物精油组合物的另一个优选示例可以包含：(1) 0.005%的香芹酚和 0.005%的百里香酚；(2)
25 0.1%的柠檬油；(3) 99.58%的亚洲薄荷素油；(4) 0.005%的月桂叶油；(5) 0.25%的广藿香油；(6) 0.005%的天竺葵油；和(7) 0.05%的紫苏油，以上百分比基于组合物的总重。

例如但不限于，本申请所述的抗微生物精油组合物的又一个优选示例可以包含：(1) 0.005%的香芹酚和 0.005%的百里香酚；(2)
30 99.5%的柠檬油；(3) 0.25%的亚洲薄荷素油；(4) 0.005%的月桂叶

油；(5) 0.18%的广藿香油；(6) 0.005%的天竺葵油；和(7) 0.05%的紫苏油，以上百分比基于组合物的总重。

例如但不限于，本申请所述的抗微生物精油组合物的又一个优选示例可以包含：(1) 51.25%的香芹酚；(2) 26.25%的百里香酚；
5 (3) 8.75%的柠檬油；(4) 7.5%的亚洲薄荷素油；(5) 2.5%的月桂叶油；(6) 0.125%的广藿香油；(7) 1.25%的天竺葵油；和(8) 2.375%的紫苏油，以上百分比基于组合物的总重。

例如但不限于，本申请所述的抗微生物精油组合物的仍然又一个优选示例可以包含：(1) 25%的香芹酚和 25%的百里香酚；(2)
10 2%的柠檬油；(3) 10%的亚洲薄荷素油；(4) 20%的月桂叶油；(5) 0.5%的广藿香油；(6) 2%的天竺葵油；(7) 5%的金银花油；(9) 4%的川芎油；(10) 0.3%的苍耳子油；和(11) 0.2%的连翘油。

本申请所述的抗微生物精油组合物中的多种成分结合在一起，通过协同作用，共同实现了优异的抗微生物性质。例如，本申请所述的
15 抗微生物精油组合物可以对选自细菌、真菌、病毒、支原体或其组合的微生物显示良好的杀灭或抑制作用。在一个方面，本申请所述细菌的示例可以包括肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、白色葡萄球菌和白色念珠菌中的一种或多种。在另一方面，本申请所述病毒的示例可以包括新冠病毒、流感
20 病毒、鼻病毒、呼吸道合胞体病毒、肠道病毒、腺病毒、疱疹病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒中的一种或多种，例如，新冠病毒。在又一方面，本申请所述的支原体可以为肺炎支原体。

例如，当使用本申请的精油组合物针对新冠病毒进行体外消杀时，
处理3分钟和30分钟的杀灭效率可高于75%，例如，高于80%、85%、
25 90%、95%、98%乃至接近100%。不希望受限于任何理论，申请人相信，精油组合物杀灭新冠病毒的机理可至少部分基于以下事实：新冠病毒具有包膜结构，属于亲脂(亲油)病毒，理论上易于被天然植物精油吸附富集，进而被灭活。申请人研究发现，本申请的抗病毒植物精油与新冠病毒原液接触混合后，可将新冠病毒从原液中“萃取”而
30 出，进而快速、高效灭活新冠病毒。本申请中所选择的多种精油成分

之间存在活性的互补和加成，相比于单方精油，实现了预料不到的协同工作，获得了显著更好的抗微生物性质。除此之外，本申请的精油组合物还可实现其他有益效果，包括但不限于，组合物中的部分成分能够阻断新冠病毒结合呼吸道上皮细胞ACE2受体（即，实现阻断/防护作用）；部分成分能够通畅呼吸、改善早期病毒性上呼吸道感染或感冒引起的鼻塞不适的成分（即，舒缓作用）。而且，本申请的精油组合物基于天然植物材料制成，气味芬芳，具有低刺激性、低腐蚀性、对人体无毒无害并且对环境友好等诸多优点。

本申请至少一实施方式还提供了包含抗微生物精油组合物的制品。制品可以包括能够对环境或人体进行微生物消杀的制品。在一个方面，本申请所述的能够对环境或人体进行微生物消杀的制品是指对人体无毒性、无刺激性、无腐蚀性、对环境友好并且能够减少或杀灭环境中或人体上的有害微生物的制品。其可以包括，例如，能够在硬表面、纺织品、皮肤、粘膜或毛发中的一种或多种上减少或杀灭微生物的制品。在本申请的上下文中，术语“硬表面”是指除了纺织品表面和人体表面之外的环境物体表面，包括但不限于天花板、墙壁、地板/地砖、电梯、楼梯、扶手、家具、餐具、车辆等生活中容易接触到的常用表面；术语“纺织品”包括但不限于衣物、帽子、毛巾、桌布、床上用品等；术语“皮肤”是指人或动物的皮肤；术语“粘膜”是指人或动物的口腔、眼部或直肠粘膜；术语“毛发”是指人的头发或体毛，或者动物的毛发或羽毛。在一些示例中，能够在硬表面、纺织品、皮肤、粘膜或毛发中的一种或多种上减少或杀灭微生物的制品可以包括选自口罩爆珠、卫生湿巾、空气清新剂（如空气凝胶或空气喷雾等）、口腔喷雾、个人盥洗用品（如洗手液、洗发水、护发素、沐浴液等）、化妆品、护肤品、空气凝胶、抑菌喷雾、表面清洁剂（如家具清洁剂、地板清洁剂、厨房清洁剂、厕所清洁剂等）和洗涤剂（如衣物洗涤剂、餐具洗涤剂等）中的一种或多种。

另外地或可选地，本申请所述的制品还可以包括防护用品。例如，防护用品可以包括选自日常服装（如内衣、外衣或袜子等）、口罩（如民用口罩、医用口罩等）、防护手套、防护衣中的一种或多种，例如，

爆珠口罩。

另外地或者可选地，本申请所述的制品还可以包括食品或保健品。例如，食品或保健品可以包括口香糖、香口丸、爆珠、凝胶糖果、硬糖、软糖、饮料、膳食补充剂中的一种或多种。

5 本申请至少一实施方式还提供了制备如上所述的抗微生物精油组合物的方法，包括将所述抗微生物精油组合物的所有成分均匀混合。在一个方面中，混合在常温常压下进行。

10 本申请至少一实施方式还提供了制备包含抗微生物精油组合物的制品的方法，包括将抗微生物精油组合物的所有成分均匀混合，制成精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠，并且将该精油母粒或精油微胶囊与制品的其他组分组合，得到所述制品。例如，该制备方法可以包括将抗微生物精油组合物的所有成分均匀混合，制成精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠；并且将制成的精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠添加到口罩（如民用口罩或医用口罩）中。在使用过程中，由此制成的
15 的口罩中的精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠（在按压破碎后）将缓慢地持续释放抗病毒精油组合物，从而对通过该口罩吸入或排出的气体（如空气）中可能存在的致病性微生物产生消杀作用。

20 以下将参考实施例对本申请进行进一步的详细解释。然而，本领域技术人员应理解，这些实施例仅为了说明的目的提供，而不是意图限制本申请。

实施例

25 下面将结合实施例对本申请的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本申请，而不应视为限定本申请的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。除非另外指明，所列出的所有量均基于总重以重量份数描述。本申请不应解释为受限于所述的具体实施例。

30 制备实施例1-13

根据下表1-2中的配方，将各组分在常温常压下混合以制备实施例1-13的精油组合物，其中实施例1-7是本申请的精油组合物，实施例8-13是对比精油组合物。

表1.

	实施 例1	实施 例2	实施 例3	实施 例4	实施 例5	实施 例6	实施 例7
香芹 酚	5	51.25	25	20	25	0.05	67
百里 香酚	5	26.25	25	20	25	0.0001	0.0001
月桂 叶油	10	2.5	20	10	20	0.0001	0.0001
柠檬 油	35	8.75	2	5	5	0.65	0.21
天竺 葵油	5	1.25	2	5	5	0.05	0.016
紫苏 油	9.5	2.4	-	1	3	5	1.65
亚洲 薄荷 素油	30	7.5	0.5	5	5	94	31
广藿 香油	0.5	0.125	10	20	0.5	0.25	0.08
金银 花油	-	-	5	10	0.2	-	-
川芎 油	-	-	4	1	2	-	-
苍耳 子油	-	-	0.3	1	0.3	-	-
连翘	-	-	0.2	2	2	-	-

油							
椒样薄荷油	-	-	-	-	5	-	-
檀香油	-	-	-	-	1	-	-
牡荊叶油	-	-	-	-	0.5	-	-
杭白菊油	-	-	-	-	0.5	-	-

[注]: 1. 上表中的数字代表基于组合物总重的百分比;
2. “-”表示不包含相应组分。

表2.

	实施 例8	实施 例9	实施 例10	实施 例11	实施 例12	实施 例13
香芹酚	20	50	-	20	5	-
百里香酚	-	50	-	20	-	20
月桂叶油	-	-	20	20	-	-
柠檬油	-	-	70	20	30	-
天竺葵油	-	-	10	20	-	-
紫苏油	-	-	-	-	15	30
亚洲薄荷素油	30	-	-	-	50	10
广藿香油	-	-	-	-	-	-
金银花油	20	-	-	-	-	20
川芎油	5	-	-	-	-	-
苍耳子油	5	-	-	-	-	-
连翘油	10	-	-	-	-	20
椒样薄荷油	-	-	-	-	-	-

檀香油	10	-	-	-	-	-
牡荆叶油	-	-	-	-	-	-
杭白菊油	5	-	-	-	-	-

[注]: 1. 上表中的数字代表基于组合物总重的百分比;

2. “-”表示不包含相应组分。

测试例1

- 5 分别制备实施例1的精油组合物（标记为食品级精油（FEO））和实施例3的精油组合物（标记为化妆品级精油（CEO））。

根据下面的测试方法，对FEO和CEO的细胞毒性和灭活新冠病毒（SARS-Cov-2）的效果进行测试。

检验设备
☒ 生物安全柜（生产商：NUAIR LABGARD；设备型号：NU-437-600S）
☒ CO ₂ 培养箱（生产商：Thermo Scientific；设备型号：471）
☒ 倒置显微镜（生产商：EVOS；设备型号：XL Core）
检验试剂
☒ SARS-CoV-2 病毒（Vero E6 细胞扩增，代次：P7；滴度：4.0×10 ⁷ PFU/mL）
☒ DMEM 基础培养基（品牌：Gibco；货号：11965092；批号：2122728）
☒ Vero E6 细胞（来源：中国科学院细胞库；代次：第 8 代）
☒ 胎牛血清（品牌：Gibco；货号：16140071；批号：1624166）
☒ 青霉素-链霉素双抗（品牌：Bioind；货号：03-031-1B；批号：1919555）
☒ 0.25%胰酶-EDTA（品牌：Gibco；货号：25200072；批号：2085552）
实验操作
A. 接种细胞：
1) 冻存 Vero E6 细胞的复苏： 冻存细胞置于在 37℃ 水浴中融化，1000rpm/min 离心 3 分钟后，去除冻存液，加入 20mL 新鲜培养基(DMEM with 10% FBS) 并转移至 T75 细胞培养瓶中，在 37℃ 二氧化碳培养箱中继续培养。24 小时后，观察细胞生长情况，确认是否恢复正常生长。
2) 细胞的传代： 用 5mL PBS 清洗 Vero-E6 细胞表面 1 次，用 3mL 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞，放置到培养箱中，待观察到细胞有变圆、脱落现象，即加入 6mL 新鲜培养基终止消化。将消化下的细胞 1000rpm/min 离心 3 分钟，以 1:5 的比例接种到新的培养瓶中。
3) 接种细胞： 取处于对数生长期的 Vero-E6 细胞，用 3mL 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞，细胞计数，用新鲜培养基调整细胞密度至 1×10 ⁶ 个/mL；取上述细胞 3 mL，再加入新鲜培养基 7 mL，制备得到细胞密度为 3×10 ⁵ 个/mL 的细胞悬液，接种到 96 孔板中，每孔 100 μL，每孔细胞数 3×10 ⁴ 个。放入 37℃ 二氧化碳培养箱

中持续培养过夜。 B. 病毒感染：2021-3-29 4) 病毒分装： 病毒储存液滴度为 <u>4.0×10^7</u> PFU/mL，取病毒储存液 600μL，分别加入 6 个 1.5mL EP 管（100μL/管）。 5) 病毒预处理： 将上述 6 个装有病毒溶液的 EP 管分别加入 100μL 对应的 FEO、CEO 或 ddH₂O，分别混合放置 3 分钟或 30 分钟，分别标为“3-FEO”、“30-FEO”、“3-CEO”、“30-CEO”、“3-Ctrl”、“30-Ctrl”。 6) 稀释病毒： 分别使用 2%FBS 的维持培养基依次 <u>10</u> 倍稀释 6 份病毒溶液。 7) 病毒感染： 弃去 96 孔板中已贴壁生长的 Vero E6 细胞上层培养基，每孔分别加入 <u>100</u> μL 放置不同时间、混合不同精油或 ddH₂O 的病毒溶液，每份样品设置 <u>4</u> 个重复，放入 <u>37</u> $^{\circ}$C 二氧化碳培养箱持续培养。 8) 细胞病变观察： 48-72 小时后在显微镜下观察细胞病变情况，计算样品中的病毒 TCID₅₀ 值。 9) 计算滴度、统计分析结果： Karber 法 $\lg \text{TCID}_{50} = L + d (S - 0.5)$ L: 病毒的最低稀释倍数的对数 d: 稀释系数，即组距 S: 细胞病变比值的和（不包括最低稀释度细胞病变的比值）数	
检验结果	
48-72 小时后，显微镜下观察细胞病变。“3-FEO”、“3-CEO”、“30-CEO”、“30-FEO”四个实验组均发现精油具有细胞毒性。其中，“3-FEO”和“30-FEO”两组中，病毒和精油混合（100μL+100μL）后经过 10^1、10^2、10^3 倍稀释后仍具有细胞毒性，细胞出现大量死亡；“3-CEO”和“30-CEO”两组中，病毒和精油混合（100μL+100μL）后经过 10^1、10^2、10^3、10^4、10^5 倍稀释后仍具有细胞毒性，细胞出现大量死亡。而且，精油与病毒的孵育时间不影响精油的细胞毒性。因此，本实验中出现细胞死亡的处理组无法根据细胞病变程度判断病毒灭活状况，具体结果见附件 1。 通过计算，实验对照组（即“3-Ctrl”和“30-Ctrl”）感染性滴度为：$3.56 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$。与对照组相比，病毒与 CEO 孵育 3 分钟与 30 分钟的滴度均在 $< 632412 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$，与 FEO 孵育 3 分钟与 30 分钟的滴度均在	

< 6324 TCID₅₀/mL。

因此，基于本实验体系，可以得出结论，食品级精油(FEO)和化妆品级精油(CEO)对于新型冠状病毒存在不同程度的杀灭作用，其中 FEO 处理 3 分钟和 30 分钟的天杀效率 > 99.82%，CEO 处理 3 分钟和 30 分钟的天杀效率 > 82.22%。

表 1 消毒精油灭活新型冠状病毒感染滴度的影响

组别	病毒滴度 (TCID ₅₀ /mL)
3-Ctrl	3556313
3-CEO	< 632412
3-FEO	< 6324
30-Ctrl	3556313
30-CEO	< 632412
30-FEO	< 6324

附件

1. 细胞病变结果

植物精油灭活新型冠状病毒(SARS-Cov-2)的效果研究实验记录

附件 1：细胞病变结果

Plate 01			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3-Ctrl	A		+	+	+	+	+	-	-	-			
	B		+	+	+	+	+	+	-	-			
	C		+	+	+	+	+	+	-	-			
	D		+	+	+	+	+	+	-	-			
3-CEO	E		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	F		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	G		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	H		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			

Plate 02			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3-FEO	A		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	B		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	C		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	D		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
30-Ctrl	E		+	+	+	+	+	-	-	-			
	F		+	+	+	+	+	+	-	-			
	G		+	+	+	+	+	+	-	-			
	H		+	+	+	+	+	+	-	-			

Plate 03			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30-CEO	A		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	B		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	C		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
	D		CC	CC	CC	CC	CC	-	-	-			
30-FEO	E		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	F		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	G		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			
	H		CC	CC	CC	-	-	-	-	-			

CC: Cell cytotoxicity, 细胞毒性

+: 出现细胞病变

-: 无细胞病变产生

由以上结果可见，本申请的精油组合物FEO和CEO具有可接受的细胞毒性和极好的新冠病毒杀灭效果。

测试例2

5 根据以下方式，在细胞水平上评价实施例及对比例的精油组合物抗新冠病毒（SARS-CoV-2）效果。

材料

细胞：VeroE6细胞。

10 病毒：SARS-CoV-2（南非变异株），滴度为TCID₅₀ = 10⁻⁵/100 μL，使用病毒滴度为100TCID₅₀。

精油：采用倍比稀释法用细胞培养基将复方精油稀释成6个浓度。

15 方法

（一）受试药物抗病毒实验

（1）受试药物：

表2：复方精油细胞毒性药物名称、实验浓度和分组

分组		药物浓度（μL/L）
实验组	复方精油	600、300、150、75、37.5、18.75
细胞对照组	培养基	

20

表3：复方精油细胞毒性实验药物名称、实验浓度和分组

分组		药物浓度（μL/L）
实验组	复方精油	300、150、75、37.5、18.75、9.375

病毒对照组	SARS-CoV-2病毒液	100 TCID ₅₀ /孔
细胞对照组	培养基	

(2) 无菌96孔培养板,每孔加入100 μL浓度为1×10⁵ cells/mL VeroE6细胞, 37℃ 5% CO₂培养24小时;

(3) 培养板实验组和病毒对照组加入100 TCID₅₀病毒液100 μL/孔, 37℃ 5% CO₂培养箱吸附2 h;

(4) 2 h后, 弃去96孔培养板中细胞培养液; 受试药物稀释成表1中的各个浓度, 每个浓度3个复孔, 100 μL/孔加入上述药液;

(5) 同时设立细胞对照、空白对照(溶剂对照)、病毒对照(阴性对照)和对比药物对照;

(6) 细胞37℃, 5% CO₂孵箱孵育3天;

(7) 光学显微镜下观察细胞病变(CPE),细胞出现病变程度按以下6级标准记录:“-”无病变出现;“±”为细胞病变少于10%;“+”为细胞病变约25%;“++”为细胞病变约50%;“+++”为约75%的细胞出现病变;“++++”为75%以上病变。采用Reed-Muench法或GraphPad Prism5.0计算半数有效浓度(IC₅₀)。判断药效标准: 具有50%的抑制病毒CPE的浓度视为有效浓度。

(8) 实验条件: 以上实验操作均在BSL-3实验室内完成。

20 结果

1、MTS检测复方精油细胞毒性:

待VeroE6细胞生长状态最好时, 用0.02% EDTA和0.5%胰酶消化细胞, 用生长液调整细胞至所需浓度, 将该细胞液加入96孔细胞培养板中, 100 μL/孔, 于37℃、5% CO₂培养箱中培养至致密细胞单层。

25 用培养基将复方精油稀释为不同浓度, 分别为600μL/L、300μL/L、150μL/L、75μL/L、37.5μL/L、18.75μL/L; 加入细胞培养板中, 100 μL/孔。每个稀释浓度平行做3个复孔, 同时设正常细胞对照。于37℃ 5% CO₂培养箱中培养, MTS法检测细胞活性, 具体结果见附表1。各

组复方精油在300 $\mu\text{L/L}$ 对VeroE6细胞均无毒性，故后续实验选择300 $\mu\text{L/L}$ 为最高实验浓度。

2、CPE观察：病毒感染72h后，正常细胞对照组无CPE，病毒对照组，CPE明显，不同精油浓度组表现出对CPE不同的抑制效

- 5 果，通过观察细胞病变（CPE）并记录实验结果，采用Reed-Muench法或GraphPad Prism5.0计算半数有效浓度(IC_{50})，具体结果见附表2。各组复方精油均具有抗病毒作用，与对比比例比较，实施例均显著优于对比比例。

附表1 复方精油细胞毒性结果

精油浓度 ($\mu\text{L/L}$)	抑制率 (%)												
	实 施 例1	实 施 例2	实 施 例3	实 施 例4	实 施 例5	实 施 例6	实 施 例7	实 施 例8	实 施 例9	实 施 例10	实 施 例11	实 施 例12	实 施 例13
600	24.38 ± 0.27	21.77 ± 0.21	26.45 ± 2.22	32.54 ± 0.71	32.90 ± 0.71	27.94 ± 1.64	25.85 ± 1.38	26.15 ± 1.46	26.42 ± 2.11	28.59 ± 1.35	24.48 ± 1.45	26.40 ± 0.67	27.69 ± 0.84
300	9.16 $\pm$ 0.72	7.93 $\pm$ 0.58	8.90 $\pm$ 0.73	7.46 $\pm$ 0.50	7.36 $\pm$ 0.70	11.42 ± 0.90	8.56 $\pm$ 0.56	10.68 ± 1.00	9.80 $\pm$ 0.51	0.57 $\pm$ 0.30	2.49 $\pm$ 0.85	11.45 ± 1.04	6.61 $\pm$ 0.24
150	1.42 $\pm$ 1.43	4.70 $\pm$ 0.40	5.04 $\pm$ 0.66	1.82 $\pm$ 1.17	3.55 $\pm$ 0.31	1.43 $\pm$ 0.40	3.77 $\pm$ 0.34	5.40 $\pm$ 1.39	2.00 $\pm$ 0.37	2.90 $\pm$ 0.83	6.16 $\pm$ 0.45	5.32 $\pm$ 1.40	5.83 $\pm$ 0.27
75	1.71 $\pm$ 0.38	2.14 $\pm$ 0.23	1.12 $\pm$ 0.55	2.38 $\pm$ 0.30	1.34 $\pm$ 0.87	1.42 $\pm$ 0.49	0.66 $\pm$ 0.43	2.19 $\pm$ 0.35	1.75 $\pm$ 0.72	1.53 $\pm$ 0.78	1.54 $\pm$ 0.87	1.35 $\pm$ 0.71	2.07 $\pm$ 0.36
37.5	0.25 $\pm$ 0.28	-2.78 $\pm$ 0.33	-5.96 $\pm$ 0.42	-1.57 $\pm$ 0.15	-5.17 $\pm$ 0.39	-1.88 $\pm$ 0.23	1.55 $\pm$ 0.26	-3.81 $\pm$ 0.49	-0.95 $\pm$ 0.35	-5.63 $\pm$ 0.13	-1.83 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.26	-2.35 $\pm$ 0.42
18.75	-5.17 $\pm$ 0.19	-5.87 $\pm$ 0.23	-0.49 $\pm$ 0.19	-0.34 $\pm$ 0.21	-3.53 $\pm$ 0.14	-6.47 $\pm$ 0.14	-5.41 $\pm$ 0.20	0.04 $\pm$ 0.03	-6.17 $\pm$ 0.18	-0.66 $\pm$ 0.11	-3.60 $\pm$ 0.09	-6.22 $\pm$ 0.07	1.12 $\pm$ 0.08

附表2 复方精油抗新型冠状病毒结果

精油浓度 ($\mu\text{L/L}$)	抑制率 (%)												
	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6	实施例7	实施例8	实施例9	实施例10	实施例11	实施例12	实施例13
9.375	2.49 $\pm$ 0. 09**	0.13 $\pm$ 0. 16**	2.01 $\pm$ 0. 14**	-1.02 $\pm$ 0. 18**	-1.82 $\pm$ 0. 07*	1.50 $\pm$ 0. 16**	0.50 $\pm$ 0. 05**	-2.97 $\pm$ 0. 07	-2.98 $\pm$ 0. 10	-3.29 $\pm$ 0. 16	-3.99 $\pm$ 0. 22	-3.12 $\pm$ 0. 14	-3.39 $\pm$ 0. 18
18.75	6.90 $\pm$ 0. 15**	5.01 $\pm$ 0. 32**	6.32 $\pm$ 0. 28**	3.48 $\pm$ 0. 09*	3.03 $\pm$ 0. 13*	5.69 $\pm$ 0. 19**	5.67 $\pm$ 0. 39**	1.87 $\pm$ 0. 17	2.24 $\pm$ 0. 41	1.71 $\pm$ 0. 17	0.50 $\pm$ 0. 08	2.18 $\pm$ 0. 11	0.93 $\pm$ 0. 46
37.5	15.18 $\pm$ 0. 57**	10.92 $\pm$ 0. 50**	13.18 $\pm$ 0. 66**	10.00 $\pm$ 0. 60*	9.47 $\pm$ 0. 33	12.46 $\pm$ 0. 82**	11.31 $\pm$ 0. 26**	4.96 $\pm$ 0. 27	8.71 $\pm$ 0. 53	7.14 $\pm$ 0. 89	3.84 $\pm$ 0. 53	8.53 $\pm$ 0. 08	6.96 $\pm$ 0. 45
75	35.47 $\pm$ 0. 30**	24.88 $\pm$ 0. 35**	31.85 $\pm$ 0. 62**	21.27 $\pm$ 0. 74*	20.14 $\pm$ 0. 93	31.00 $\pm$ 0. 53**	27.26 $\pm$ 0. 93**	12.44 $\pm$ 0. 67	19.07 $\pm$ 0. 82	14.69 $\pm$ 0. 22	11.05 $\pm$ 0. 85	17.43 $\pm$ 1. 44	12.31 $\pm$ 0. 44
150	56.31 $\pm$ 0. 49**	43.64 $\pm$ 1. 35**	50.48 $\pm$ 0. 54**	41.30 $\pm$ 1. 23*	40.49 $\pm$ 0. 51	46.26 $\pm$ 0. 96**	45.57 $\pm$ 1. 11**	26.75 $\pm$ 0. 41	37.10 $\pm$ 1. 07	32.79 $\pm$ 1. 36	26.72 $\pm$ 0. 68	36.20 $\pm$ 0. 83	29.50 $\pm$ 0. 11
300	95.86 $\pm$ 1. 90**	79.80 $\pm$ 1. 29**	91.80 $\pm$ 0. 8**1	79.44 $\pm$ 2. 40*	76.40 $\pm$ 1. 06**	86.04 $\pm$ 2. 05**	82.01 $\pm$ 2. 01**	55.82 $\pm$ 2. 08	73.68 $\pm$ 1. 05	60.96 $\pm$ 1. 18	52.27 $\pm$ 2. 06	67.19 $\pm$ 2. 00*	60.36 $\pm$ 0. 36
IC50($\mu\text{L/L}$)	108.2	153.5	122.4	162.5	169.9	134.3	144.6	264.4	182.4	229.5	282.1	200.5	239.3

与对比例1组比较, **p<0.01, *p<0.05

由以上实验结果可见, 本申请的精油组合物显著优于对比例。

测试例3

根据以下方式, 在细胞水平上评价实施例及对比例的精油组合物
针对流感病毒、鼻病毒和呼吸道合胞体病毒的体外抗病毒效果。

5 实验材料:

1、受试组合物: 根据下表4中列出的配方组成, 制备复方精油1-10, 其中, 复方精油8为实施例2的精油组合物, 复方精油9为实施例1的精油组合物, 复方精油10为实施例3的精油组合物。

表4.

序号	组成
1	香芹酚 50%、百里香酚 50%
2	月桂叶油 20%、柠檬油 70%、天竺葵油 10%
3	月桂叶油 10%、紫苏油 9.5%、亚洲薄荷素油 35%、广藿香油 0.5%、柠檬油 35%、天竺葵油 10%
4	紫苏油 20%、亚洲薄荷素油 20%、广藿香油 5%、金银花油 15%、川芎油 10%、苍耳子油 10%、连翘油 20%
5	月桂叶油 30%、亚洲薄荷素油 20%、柠檬油 10%、天竺葵油 10%、金银花油 10%、川芎油 5%、广藿香油 5%、苍耳子油 5%、连翘油 5%
6	亚洲薄荷素油 94%、紫苏油 5%、广藿香油 0.25%、柠檬油 0.65%、香芹酚 0.05%、香叶油 0.05%
7	亚洲薄荷素油 31%、紫苏油 1.65%、广藿香油 0.08%、柠檬油 0.21%、香芹酚 67%、香叶油 0.016%
8	香芹酚 51.25%、百里香酚 26.25%、月桂叶油 2.5%、紫苏油 2.4%、亚洲薄荷素油 7.5%、广藿香油 0.125%、柠檬油 8.75%、天竺葵油 1.25%
9	香芹酚 5.0%、百里香酚 5.0%、月桂叶油 10.0%、紫苏油 9.5%、亚洲薄荷素油 30.0%、广藿香油 0.5%、柠檬油 35.0%、天竺葵油 5.0%
10	香芹酚 25%、百里香酚 25%、月桂叶油 20%、亚洲薄荷素油 10%、柠檬油 5%、天竺葵油 5%、金银花油 5%、川芎油 4%、广藿香油 0.5%、苍耳子油 0.3%、连翘油 0.2%

10 2、细胞: Vero-E6 细胞。

3、病毒:

毒株名称	来源
A/PR/8/34(H1N1)	ATCC
A/Aichi/2/68(H3N2)	ATCC
B/Lee/1940(FluB)	ATCC
人鼻病毒(hRV)	ATCC
呼吸道合胞体病毒(RSV)	ATCC

实验方法

1、细胞培养和准备:

5 1.1 Vero-E6 细胞复苏:

冻存细胞置于 37℃ 水浴中快速融化，800 rpm/min 离心 5 分钟后，去除冻存液，加入 5mL 新鲜培养基（DMEM，10% FBS）并转移至 T25 细胞培养瓶中，在 37℃ 二氧化碳培养箱中继续培养。24 小时后，观察细胞生长情况，确认是否恢复正常生长。

10 1.2 细胞传代:

用 5mL PBS 清洗 Vero-E6 细胞表面 2 次，用 1mL 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞，放置到培养箱中，待观察到细胞有变圆、脱落现象，立即加入 4mL 新鲜培养基终止消化。将消化下的细胞 800 pm/min 离心 5 分钟，以 1:1 的比例接种到新的 T75 培养瓶中。

15 1.3 接种细胞:

取对数生长期的 Vero-E6 细胞，用 3mL 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞，离心、重悬细胞后，铺细胞至 96 孔板，放入 37℃ 二氧化碳培养箱中持续培养。

2、Vero-E6 细胞毒性试验

20 2.1 精油的稀释:

取 60μL 受试精油加入 60μL 维持培养液，混合均匀，取 100μL 依次用维持培养液进行 10 倍系列稀释。

2.2 细胞毒性测定:

约 20 小时后，Vero-E6 密度达 90%，弃去 96 孔板中的 Vero-

E6 细胞上层培养基，PBS 洗 2 次，取精油稀释液加入 96 孔板中，设置细胞对照组（N，不加精油，用维持培养液代替）。72 小时肉眼观测细胞状态。

3、病毒的处理与细胞感染

5 3.1 病毒和精油的混合处理：

取 EP 管加入 200μL 病毒溶液，每个病毒株各 2 个 EP 管，将上述 2 个装有病毒溶液的 EP 管分别加入 200μL 精油或 DMEM 溶液，每个 EP 管共 400μL 混合液。混合后室温放置 60 分钟，分别标为 FEO（精油加病毒溶液混合处理 60 分钟）、Ctrl（DMEM 加病毒溶液混合处理 60 分钟）。

3.2 病毒精油混合液的稀释：

室温放置 60 分钟，每管分别取 100μL，用病毒稀释液依次 10 倍稀释病毒精油混合液，每组做 3 次重复。

3.3 细胞感染：

15 在已铺满层 Vero-E6 细胞的 96 孔板中，每孔分别加入 100μL 精油-病毒或 DMEM-病毒的稀释液，每份稀释度样品设置 6 个重复孔。设置病毒阳性对照孔和正常细胞孔，放入 37℃二氧化碳培养箱中持续培养。

3.4 细胞病变观察：

20 72 小时后在显微镜下观察细胞病变情况，按 Reed-Muench 公式计算每组的 TCID₅₀ 值，并对比精油对病毒的抑制率。

距离比例=（高于 50%病变率的百分数-50%）/（高于 50%病变率的百分数-低于 50%病变率的百分数）；

25 lgTCID₅₀ = 距离比例×稀释倍数的对数+高于 50%病变率的稀释度的对数

抑制率=（对照孔病毒滴度-实验孔病毒滴度）/对照孔病毒滴度×100%

3.5 实验条件：

以上实验操作均在 BSL-3 实验室内完成。

实验结果

- 1、复方精油细胞毒性结果：在 72 小时，肉眼观察精油作 10^{-1} - 10^{-4} 稀释后，实验孔细胞出现死亡；精油作 10^{-5} 稀释后作用的细胞与对照组细胞相比，形态正常，无明显差异。因此，精油肉眼观对 Vero-E6 细胞的最大无毒浓度为精油原液作 10^{-5} 稀释。
- 2、精油抑制病毒作用结果：病毒感染 72 小时后，正常细胞对对照组无 CPE，病毒对照组 CPE 明显，不同精油浓度组表现出对 CPE 不同的抑制效果，由各组病毒滴度计算各组精油的病毒抑制率，具体结果见表 5-9，复方精油病毒抑制率的汇总结果见表 10 和图 1，结果表明各组复方精油均具有一定的抗病毒作用，复方精油 9、10、1 作用相当，优于 7、8；优于 3、6；显著优于 2、4、5。

表 5. 复方精油对 H1N2 的抑制作用

精油组 方	平均病毒滴度对 数值 $\lg\text{TCID}_{50}$	平均病毒总数 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$	H1N1 病毒抑制率%
1	3.57	3.72×10^3	98.68 ± 12.58
2	4.68	4.79×10^4	58.72 ± 7.41
3	4.54	3.47×10^4	79.12 ± 3.32
4	4.72	5.25×10^4	46.00 ± 6.45
5	4.60	3.98×10^4	64.84 ± 6.08
6	4.20	1.58×10^4	84.68 ± 5.43
7	4.28	1.91×10^4	83.12 ± 5.48
8	4.01	1.02×10^4	85.65 ± 10.42
9	1.82	6.61×10^1	99.83 ± 1.35
10	3.50	3.16×10^3	98.72 ± 5.79

表 6. 复方精油对 H3N2 的抑制作用

精油组 方	平均病毒滴度对 数值	平均病毒总数 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$	H3N2 病毒抑制率%
----------	---------------	--	----------------

	lgTCID ₅₀		
1	3.29	1.95×10³	95.68±12.58
2	4.72	5.25×10 ⁴	58.72±7.41
3	4.37	2.34×10 ⁴	79.12±3.32
4	4.88	7.59×10 ⁴	56.00±6.45
5	4.69	4.90×10 ⁴	64.84±6.08
6	4.30	2.00×10 ⁴	84.68±5.43
7	4.55	3.55×10 ⁴	73.12±5.48
8	4.23	1.70×10 ⁴	85.65±10.42
9	2.16	1.45×10²	98.83±1.35
10	3.11	1.29×10³	96.72±5.79

表 7. 复方精油对 FluB 的抑制作用

精油组 方	平均病毒滴度对 数值 lgTCID ₅₀	平均病毒总数 TCID ₅₀ /ml	FluB 病毒抑制率%
1	1.55	3.55×10¹	99.12±3.80
2	4.62	4.17×10 ⁴	59.66±6.64
3	3.55	3.55×10 ³	88.84±12.19
4	4.55	3.55×10 ⁴	61.55±11.48
5	4.15	1.41×10 ⁴	63.66±6.68
6	3.77	5.89×10 ³	84.80±7.21
7	3.65	4.47×10 ³	86.05±3.90
8	2.38	2.40×10 ²	92.72±5.62
9	2.02	1.05×10²	98.67±4.16
10	2.13	1.35×10²	97.97±2.11

表 8. 复方精油对 hRHV 的抑制作用

精油组	平均病毒滴度对	平均病毒总数	hRHV
-----	---------	--------	------

方	数值 lgTCID ₅₀	TCID ₅₀ /ml	病毒抑制率%
1	2.98	9.55×10 ²	95.28±3.39
2	4.67	4.68×10 ⁴	54.30±5.93
3	4.01	1.02×10 ⁴	71.09±10.87
3	4.78	6.03×10 ⁴	52.51±5.96
5	4.34	2.19×10 ⁴	55.99±10.24
6	3.61	4.07×10 ³	76.72±6.43
7	3.87	7.41×10 ³	74.27±3.48
8	3.54	3.47×10 ³	78.25±5.01
9	2.13	1.35×10 ²	98.49±4.28
10	2.34	2.19×10 ²	96.13±2.04

表 9. 复方精油对 RSV 的抑制作用

精油组 方	平均病毒滴度对 数值 lgTCID ₅₀	平均病毒总数 TCID ₅₀ /ml	RSV 病毒抑制率%
1	2.33	2.14×10 ²	98.07±3.65
2	4.02	1.05×10 ⁴	53.15±6.64
3	3.91	8.13×10 ³	76.11±11.9
4	4.32	2.09×10 ⁴	46.50±6.52
5	4.15	1.41×10 ⁴	50.31±11.2
6	3.82	6.61×10 ³	78.24±9.97
7	3.65	4.47×10 ³	83.58±9.61
8	3.46	2.88×10 ³	83.88±8.19
9	2.45	2.82×10 ²	97.98±6.67
10	2.67	4.68×10 ²	97.45±5.49

表 10. 复方精油对 H1N1、H3N、FluB、hRHV、RSV 的抑制率比较

精油组方	H1N1	H3N2	FluB	hRV	RSV
1	98.68±12.58	95.68±12.58	99.12±3.80	95.28±3.39	98.07±3.65
2	58.72±7.41	58.72±7.41	59.66±6.64	54.30±5.93	53.15±6.64
3	83.12±5.48	73.12±5.48	88.84±12.19	71.09±10.87	76.11±11.9
4	46.00±6.45	56.00±6.45	61.55±11.48	52.51±5.96	46.50±6.52
5	64.84±6.08	64.84±6.08	63.66±6.68	55.99±10.24	50.31±11.2
6	84.68±5.43	84.68±5.43	84.80±7.21	76.72±6.43	78.24±9.97
7	85.65±10.42	85.65±10.42	86.05±3.90	74.27±3.48	83.58±9.61
8	79.12±3.32	79.12±3.32	92.72±5.62	78.25±5.01	83.88±8.19
9	99.83±1.35	98.83±1.35	98.67±4.16	98.49±4.28	97.98±6.67
10	98.72±5.79	96.72±5.79	97.97±2.11	96.13±2.04	97.45±5.49

测试例4

根据以下方式，在细胞水平上评价实施例及对比例的精油组合物针对多种革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的体外抑菌作用。

5

实验材料：

1、受试组合物：本测试例中所用的受试组合物与测试例3中所用的复方精油1-10相同，其中，复方精油8为实施例2的精油组合物，复方精油9为实施例1的精油组合物，复方精油10为实施例3的精油组合物。

10

2、标准菌株：

标准菌株	来源
肺炎双球菌（菌号 31001）	中国药品生物制品检定所
金黄色葡萄球菌（菌号 26112）	中国药品生物制品检定所
表皮葡萄球菌（菌号 26487）	中国药品生物制品检定所
卡他球菌（菌号 29103）	中国药品生物制品检定所
大肠杆菌（菌号 44155）	中国药品生物制品检定所
痢疾杆菌（菌号 51592）	中国药品生物制品检定所

3、培养基：普通肉汤培养基、普通琼脂培养基和血清琼脂培养基，均按常规方法制备。

实验方法

- 5
- 选用标准三株革兰氏阳性菌（肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌）和三株革兰氏阴性菌（卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌），采用试管法观察复方精油体外对标准菌株的抑制作用。
- （1）精油稀释：将精油原液 1ml 稀释 5 倍即精油浓度为 200μL/ml，再按倍比稀释法稀释，使精油药液终浓度分别为 200、100、50、25、
- 10
- 12.5、6.25、3.13、1.56、0.78μL/ml 共 9 个浓度。
- （2）菌液的制备：取培养 18h 的肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌培养物，分别用 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释至 10⁻⁷-10⁻⁵ 点所加菌落数。
- （3）试验方法：将晾干的含有 1000 CFU 菌液的上述药敏纸片，
- 15
- 置 8 种不同浓度的复方精油中浸泡 1h，分别置于 10ml TSB 37℃ 培养 48h，观察 TSB 是否浑浊，同时接种于各菌株分离琼脂平板，与 37℃ 培养 24h，观察是否有菌落生长。同时设置不加精油药液的阳性对照和加精油不加菌株的阴性对照，每个重复 3 次。以无菌生长的最低精油浓度作为对该菌株的最小抑菌浓度（MIC）。

20

实验结果

在本试验条件下，复方精油对常见的革兰氏阳性菌（肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌）和革兰氏阴性菌（卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌）均见不同程度的抑制作用。由表 11、图 2、图 3 中

25

最小抑菌浓度结果可见，实施例 9、10、1 作用相当，优于 3、6、7、8，显著优于 2、4、5。

表 11. 复方精油体外对标准菌株的最小抑菌浓度（MIC, μL/ml）

精油组方	肺炎双球菌	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	卡他球菌	大肠杆菌	痢疾杆菌
1	3.13	6.25	3.13	25	6.25	12.5

2	100	25	50	50	100	50
3	25	50	12.5	12.5	50	50
4	50	100	25	25	100	50
5	50	100	12.5	100	25	50
6	12.5	50	12.5	25	25	50
7	12.5	12.5	25	25	50	25
8	12.5	25	12.5	12.5	50	25
9	6.25	3.13	1.56	6.25	6.25	12.5
10	3.13	6.25	6.25	3.13	12.5	12.5

测试例 5

根据《消毒技术规范》2002 年版-2.1.3.4 空气消毒效果模拟现场试验的方法,测试了实施例 1 的精油组合物(标记为食品级精油(FEO))

5 针对白色葡萄球菌的空气消毒效果。

量取 200 mL FEO, 加入雾化器中, 开启最大档雾化 1 小时后, 使用 BY-300 空气微生物采样器以 28.3 升/分钟的抽风量采样。处理对照组采样时间为 30s, 处理实验组采样时间为 5 min, 实验舱大小为 20 m³。对杀灭率实验结果进行处理以消除微生物在空气中自然消亡

10 因素的影响。结果如下表 12 所示。

表 12.

作用时间	测试微生物	序号	空气中细菌总数	杀灭率
0 (CK)	白色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus albus</i>) 8032	1	2.3 x 10 ⁵	-
		2	1.6 x 10 ⁵	-
		3	1.4 x 10 ⁵	-
1h	白色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus albus</i>) 8032	1	1.8 x 10 ⁴	86.58
		2	1.2 x 10 ⁴	89.50
		3	1.2 x 10 ⁴	87.23

由以上结果可见, 本申请的精油组合物针对空气中的白葡萄球菌具有良好的消毒作用。

测试例 6

参照《消毒技术规范》2002 年版-2.1.1.10.7 的病毒灭活试验方法，测试了实施例 1 的精油组合物（标记为食品级精油（FEO））针对肠道病毒 71、腺病毒、疱疹病毒、柯萨奇病毒、甲型流感病毒 H1N1、脊髓灰质炎病毒的病毒灭活作用。结果显示：

- 以 FEO 原液处理肠道病毒 71 型（ATCC VR-1432，宿主名称：Vero 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）为 1.36，病毒灭活率为 95.69%；
- 以 FEO 原液处理人疱疹病毒 A5C 株（ATCC VR-2019，宿主名称：Vero 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）>4.37，病毒灭活率>99.99%；
- 以 FEO 原液处理腺病毒 3 型（ATCC VR-3，宿主名称：A454 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）为 1.61，病毒灭活率为 97.56%；
- 以 FEO 原液处理柯萨奇病毒 A21（ATCC VR-850，宿主名称：Vero 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）为 1.41，病毒灭活率为 95.97%；
- 以 FEO 原液处理甲型流感病毒 H1N1：A/PR/8/34（ATCC VR-1469，宿主名称：MDCK 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）>4.37，病毒灭活率>99.99 %；
- 以 FEO 原液处理脊髓灰质炎病毒-I 型疫苗株（宿主名称：Vero 细胞）30 min 后，平均灭活对数值（KL）为 1.24，病毒灭活率位 94.23%；
- 阴性对照组细胞生长良好，实验结果符合评价规定的全部条件。

由以上结果可见，本申请的精油组合物针对肠道病毒 71、腺病毒、疱疹病毒、柯萨奇病毒、甲型流感病毒 H1N1、脊髓灰质炎病毒有良好的病毒灭活作用。

测试例 7

参照《消毒技术规范》2002 年版-2.1.11.3 的抑菌率检测方法，测试了实施例 1 的精油组合物（标记为食品级精油（FEO））针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑菌率。结果显示，以 FEO 原

液处理大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌 2 min 后, 抑菌率均>99.9%, 符合《消毒技术规范》2002 年版-2.1.11.3 的要求。

由以上结果可见, 本申请的精油组合物针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌有良好的抑菌作用。

5

测试例 8

依据支原体培养法和《消毒技术规范》2002 年版 2.1.1.7 和 2.1.1.9 的检测方法, 测试了实施例 1 的精油组合物(标记为食品级精油(FEO))针对肺炎支原体进行了支原体生长抑制实验。结果显示, 在规定实验
10 条件下, 在 25°C 以 FEO 原液处理肺炎支原体(ATCC 15531) 30min 后, 活菌浓度对数值下降>3, 杀灭率>99%, 对肺炎支原体有杀灭效果。

由以上结果可见, 本申请的精油组合物针对肺炎支原体有良好的杀灭作用。

15

权利要求书

1. 抗微生物精油组合物, 基于组合物的总重, 所述微生物精油组合物包含:

- 5 (1) 0.0001-80%的选自香芹酚和百里香酚中的一种或多种;
- (2) 0.0001-99.9%的选自柠檬油、甜橙油、玳玳果皮油、白柠檬油和柚皮油中的一种或多种;
- (3) 0.0001-99.9%的选自亚洲薄荷素油、亚洲薄荷油、椒样薄荷油和胡薄荷油中的一种或多种;
- 10 (4) 0.0001-20%的选自月桂叶油和甘牛至油中的一种或多种;
- (5) 0.0001-20%的选自广藿香油、檀香油和迷迭香油中的一种或多种;
- (6) 0.0001-20%的选自天竺葵油、松针油和柏木油中的一种或多种; 和
- 15 (7) 任选地, 0.0001-20%的选自紫苏油、杭白菊油和牡荆叶油中的一种或多种。

2. 权利要求 1 的抗微生物精油组合物, 基于组合物的总重, 所述抗微生物精油组合物包含:

- 20 (1) 2-80%的选自香芹酚和百里香酚中的一种或多种;
- (2) 2-50%的选自柠檬油、甜橙油、玳玳果皮油、白柠檬油和柚皮油中的一种或多种;
- (3) 5-40%的选自亚洲薄荷素油、亚洲薄荷油、椒样薄荷油和胡薄荷油中的一种或多种;
- 25 (4) 2-20%的选自月桂叶油和甘牛至油中的一种或多种;
- (5) 0.1-5%的选自广藿香油、檀香油和迷迭香油中的一种或多种;
- (6) 2-20%的选自天竺葵油、松针油和柏木油中的一种或多种; 和
- 30 (7) 任选地, 2-15%的选自紫苏油、杭白菊油和牡荆叶油中的一

种或多种。

3. 权利要求 1 或 2 的抗微生物精油组合物, 基于组合物的总重, 所述抗微生物精油组合物还任选地包含选自下组的一种或多种:

- 5 (8) 0.0001-20%的金银花油;
 (9) 0.0001-20%的川芎油;
 (10) 0.0001-20%的苍耳子油; 和
 (11) 0.0001-20%的连翘油。

10 4. 权利要求 1-3 中任一项的抗微生物精油组合物, 基于组合物的总重, 所述抗微生物精油组合物包含:

- (1) 5%的香芹酚和 5%的百里香酚;
 (2) 35%的柠檬油;
 (3) 30%的亚洲薄荷素油;
15 (4) 10%的月桂叶油;
 (5) 0.5%的广藿香油;
 (6) 5%的天竺葵油; 和
 (7) 9.5%的紫苏油。

20 5. 权利要求 1-3 中任一项的抗微生物精油组合物, 基于组合物的总重, 所述抗微生物精油组合物包含:

- (1) 0.005%的香芹酚和 0.005%的百里香酚;
 (2) 0.1%的柠檬油;
 (3) 99.58%的亚洲薄荷素油;
25 (4) 0.005%的月桂叶油;
 (5) 0.25%的广藿香油;
 (6) 0.005%的天竺葵油; 和
 (7) 0.05%的紫苏油。

30 6. 权利要求 1-3 中任一项的抗微生物精油组合物, 基于组合物的

总重，所述抗微生物精油组合物包含：

- (1) 0.005%的香芹酚和 0.005%的百里香酚；
- (2) 99.5%的柠檬油；
- (3) 0.25%的亚洲薄荷素油；
- 5 (4) 0.005%的月桂叶油；
- (5) 0.18%的广藿香油；
- (6) 0.005%的天竺葵油；和
- (7) 0.05%的紫苏油。

10 7. 权利要求 1 的抗微生物精油组合物，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：

- (1) 51.25%的香芹酚；
- (2) 26.25%的百里香酚；
- (3) 8.75%的柠檬油；
- 15 (4) 7.5%的亚洲薄荷素油；
- (5) 2.5%的月桂叶油；
- (6) 0.125%的广藿香油；
- (7) 1.25%的天竺葵油；和
- (8) 2.375%的紫苏油。

20 8. 权利要求 1-3 中任一项的抗微生物精油组合物，基于组合物的总重，所述抗微生物精油组合物包含：

- (1) 25%的香芹酚和 25%的百里香酚；
- (2) 2%的柠檬油；
- 25 (3) 10%的亚洲薄荷素油；
- (4) 20%的月桂叶油；
- (5) 0.5%的广藿香油；
- (6) 2%的天竺葵油；
- (7) 5%的金银花油；
- 30 (9) 4%的川芎油；

(10) 0.3%的苍耳子油；和

(11) 0.2%的连翘油。

9. 权利要求 1-8 中任一项的抗微生物精油组合物，其中，所述微生物选自细菌、真菌、病毒、支原体及其组合。

10. 权利要求 1-9 中任一项的抗微生物精油组合物，其中，所述微生物为新冠病毒、流感病毒、鼻病毒、呼吸道合胞体病毒、肠道病毒、腺病毒、疱疹病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒中的一种或多种。

11. 权利要求 10 的抗微生物精油组合物，其中，所述微生物为新冠病毒。

12. 权利要求 1-9 中任一项的抗微生物精油组合物，其中，所述微生物为肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、卡他球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、白色葡萄球菌和白色念珠菌中的一种或多种。

13. 权利要求 1-9 中任一项的抗微生物精油组合物，其中，所述微生物为肺炎支原体。

14. 包含权利要求 1-13 中任一项的抗微生物精油组合物的制品。

15. 权利要求 14 的制品，其中，所述制品包括能够在硬表面、纺织品、皮肤、粘膜或毛发中的一种或多种上减少或杀灭微生物的制品。

16. 权利要求 14 或 15 的制品，其中，所述制品为选自口罩爆珠、卫生湿巾、空气清新剂、口腔喷雾、洗手液、洗发水、护发素、沐浴液、化妆品、护肤品、空气凝胶、皮肤抑菌喷雾、表面清洁剂和洗涤剂中的一种或多种。

17. 权利要求 14 的制品，其中，所述制品为防护用品。

18. 权利要求 14 或 17 的制品，其中，所述制品为选自民用口罩、
5 医用口罩、防护手套、防护衣中的一种或多种。

19. 权利要求 14、17 和 18 中任一项的制品，其中，所述制品为爆珠口罩。

10 20. 权利要求 14 的制品，其中，所述制品为食品或保健品。

21. 权利要求 14 或 20 的制品，其中，所述制品为选自口香糖、香口丸、爆珠、凝胶糖果、硬糖、饮料、膳食补充剂中的一种或多种。

15 22. 制备权利要求 14-21 中任一项的制品的方法，包括：

将所述抗微生物精油组合物的所有成分均匀混合，制成精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠，

将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠与所述制品的其他组分组合，得到所述制品。

20

23. 权利要求 22 的方法，其中，所述制品为民用口罩或医用口罩，

所述将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠与所述制品的其他组分组合包括将所述精油母粒或精油微胶囊或精油爆珠添加到所

25 述民用口罩或所述医用口罩中。